

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



J1050 U.S. PRO
09/919932



08/02/01

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 09 690.9
Anmeldetag: 28. Februar 2001
Anmelder/Inhaber: Degussa AG,
Düsseldorf/DE
Bezeichnung: Neue für das metY-Gen kodierende Nukleotid-
sequenzen
Priorität: 02.09.2000 DE 100 43 334.0
IPC: C 12 N, C 07 H, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. Juli 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Agurkis

Neue für das metY-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das metY-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren,

5 insbesondere L-Lysin und L-Methionin, unter Verwendung von Bakterien, in denen mindestens das metY-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie,

10 in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere

Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der 15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die

20 Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und 30 Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-

Aminosäure produzierender Stämme von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin, bereitzustellen.

10 Beschreibung der Erfindung

Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B.

20 Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

Werden im folgenden L-Methionin oder Methionin erwähnt, sind damit auch die Salze wie z.B. Methionin-Hydrochlorid oder Methionin-Sulfat gemeint.

25 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das metY-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das 30 die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

5 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

10 wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

15 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder

20 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

25 ein Polynukleotid enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend die für das metY-Gen kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum, hinterlegt gemäß Budapester Vertrag in Corynebacterium glutamicum als pCREmetY am 13.05.00 unter DSM 13556

5 und coryneforme Bakterien, in denen das metY-Gen verstärkt vorliegt, insbesondere durch den Vektor pCREmetY.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung

10 einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

15 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für O-Acetylhomoserin-Sulphydrolase kodieren, oder um solche 20 Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des O-Acetylhomoserin-Sulphydrolase-Gens aufweisen.

25 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase kodieren.

30 Solche, als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge

von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

5 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein
10 Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus
15 hergestellten Fragments.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid
20 gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80%, und besonders die zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und
25 die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren
30 produzieren, und in denen mindestens die für das metY-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise 5 die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden 10 Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung 15 *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere 20 der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

25 *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und

Brevibacterium divaricatum ATCC14020

30 oder daraus hergestellte L-Lysin produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709

Brevibacterium flavum FERM-P 1708

Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 und
Corynebacterium glutamicum DSM5715.

5 oder daraus hergestellte L-Methionin produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise

Corynebacterium glutamicum ATCC21608.

Das neue, für das Enzym O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase (EC 4.2.99.10) kodierende metY-Gen von *C. glutamicum* wurde isoliert.

Zur Isolierung des metY-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt.

Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten

15 Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual

20 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine

25 Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

30 Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHC79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). Zur Herstellung einer

Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirt eignen sich besonders solche *E. coli*

5 Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können

10 anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

15 Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical

20 Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Die neue für das Gen *metY* kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen

25 Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des *metY*-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind

30 ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen

35 Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in

Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines

5 Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 10 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

15 In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich 20 aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter 25 Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991), 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d.h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschritte durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der 30 Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die 35

Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriften durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

5 Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride
10 sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim,
15 Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von
20 50 auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt
25 erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann
30 unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des metY-Gens, gegebenenfalls in Kombination mit dem metA-Gen, in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin, produzieren.

5 Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise
10 10 wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Lysin- und L-Methionin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung
15 15 der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im
20 20 Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

25 Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei
30 Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24
35 35 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-

229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

5 Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße metY-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al.,
10 Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHs2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A
15 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

20 In den Abbildungen 1 und 2 sind Beispiele derartiger Plasmidvektoren dargestellt.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and
25 Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994)). Journal of
30 Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993),

pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, 5 Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and 10 Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological 15 Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, 20 insbesondere L-Lysin und L-Methionin vorteilhaft sein, neben dem metY-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, oder des Aminosäure-Exports zu verstärken.

So kann für die Herstellung von L-Lysin eines oder mehrere 25 Gene, ausgewählt aus der Gruppe

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086), 30
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

◦ das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

◦ das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),

5 ◦ das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (ACCESSION Number P26512),

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Methionin eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

10 ◦ das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

◦ das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

15 ◦ das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

◦ das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),

20 ◦ das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (ACCESSION Number P26512),

◦ das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA (ACCESSION Number AF052652),

◦ das für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB (ACCESSION Number AF126953),

25 ◦ das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende Gen aecD (ACCESSION Number M89931)

◦ das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA (JP-A-08107788),

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden, wobei die zusätzliche Verstärkung von metA besonders bevorzugt wird.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Lysin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des metY Gens 5 eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE: 10 1995 1975.7; DSM 13114)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Methionin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des metY Gens 15 eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE: 20 1995 1975.7; DSM 13114)
- das für die Homoserine - Kinase kodierende Gen thrB (ACCESSION Number P08210),
- das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA 25 (ACCESSION Number Q04513),
- das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC (ACCESSION Number P23669),

- o das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh (ACCESSION Number Y00151),

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren,

5 insbesondere L-Lysin und L-Methionin, vorteilhaft sein, zusätzlich zu der Überexpression des metY-Gens, gegebenenfalls in Kombination mit dem metA-Ken, unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: 10 Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder 15 repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die 20 Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den

25 Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

30 Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren

wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

5 Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und 10 Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

15 Als Schwefelquelle, insbesondere für die Herstellung schwefelhaltiger Aminosäuren, können organische und anorganische schwefelhaltige Verbindungen wie beispielsweise Sulfide, Sulfite, Sulfate und Thiosulfate verwendet werden.

20 Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium 25 können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen 30 wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie

z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die so erhaltenen, insbesondere L-Methionin enthaltenden Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-% und enthalten L-Methionin. Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30% der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren wird. Das heißt, dass während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf ≥ 0 bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.

Die in dieser Weise hergestellte, insbesondere L-Methionin haltige, Fermentationsbrühe wird anschließend weiterverarbeitet. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden wie z.B. der Zentrifugation, der Filtration, dem Dekantieren oder einer Kombination hieraus aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden. Anschließend wird diese mit bekannten Methoden wie z.B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration eingedickt beziehungsweise konzentriert. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend durch Methoden der Gefriertrocknung, der Sprühtrocknung, der Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren zu

einem vorzugsweise rieselfähigen, feinteiligen Pulver aufgearbeitet werden.

Dieses rieselfähige, feinteilige Pulver kann dann wiederum durch geeignete Kompaktier- oder Granulier-Verfahren in ein 5 grobkörniges, gut rieselfähiges, lagerbares und weitgehend staubfreies Produkt überführt werden. Vorteilhaft bei der Granulation oder Kompaktierung ist der Einsatz von üblichen organischen oder anorganischen Hilfsstoffen, beziehungsweise Trägern wie Stärke, Gelatine, 10 Cellulosederivaten oder ähnlichen Stoffen, wie sie üblicherweise in der Lebensmittel- oder Futterverarbeitung als Binde-, Gelier-, oder Verdickungsmittel Verwendung finden, oder von weiteren Stoffen wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikaten oder Stearaten.

15 Unter „rieselfähig“ versteht man Pulver, die aus einer Serie von Glasauslaufgefäßen mit verschieden großen Auslauföffnungen mindestens aus dem Gefäß mit der Öffnung 5 mm (Millimeter) ungehindert auslaufen (Klein, Seifen, Öle, Fette, Wachse 94, 12 (1968)).

20 Wie hier beschrieben, ist mit „feinteilig“, ein Pulver mit überwiegendem Anteil ($> 50\%$) einer Korngröße von 20 bis 200 μm Durchmesser gemeint. Mit „grobkörnig“ sind Produkte mit überwiegendem Anteil ($> 50\%$) einer Korngröße von 200 bis 2000 μm Durchmesser gemeint. In diesem Sinne, bedeutet 25 „staubfrei“, daß das Produkt lediglich geringe Anteile ($< 5\%$) an Korngrößen unter 20 μm Durchmesser enthält. Die Korngrößenbestimmung kann mit Methoden der Laserbeugungsspektrometrie durchgeführt werden. Die entsprechenden Methoden sind im Lehrbuch zur 30 „Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis“ von R. H. Müller und R. Schuhmann, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1996) oder im Lehrbuch „Introduction to Particle Technology“ von M. Rhodes, Verlag Wiley & Sons (1998) beschrieben.

„Lagerbar“, im Sinne dieser Erfindung, bedeutet ein Produkt, das bis zu 120 Tagen, bevorzugt bis 52 Wochen, besonders bevorzugt 60 Monate gelagert werden kann ohne das ein wesentlicher Verlust (< 5%) an Methionin auftritt.

- 5 Alternativ kann das Produkt aber auch auf einen in der Futtermittelverarbeitung bekannten und üblichen organischen oder anorganischen Trägerstoff wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikate, Schrote, Kleien, Mehle, Stärken Zucker oder andere aufgezogen und/oder mit üblichen
- 10 Verdickungs- oder Bindemitteln vermischt und stabilisiert werden. Anwendungsbeispiele und Verfahren hierzu sind in der Literatur (Die Mühle + Mischfuttertechnik 132 (1995) 49, Seite 817) beschrieben.

Schließlich kann das Produkt durch Beschichtungsverfahren („Coating“) mit Filmbildnern wie beispielsweise Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginate, Stearate, Stärken, Gummis und Celluloseether, wie in der DE-C-4100920 beschrieben, in einen Zustand gebracht werden, in dem es stabil gegenüber der Verdauung durch Tiermägen insbesondere dem Magen von Wiederkäuern ist.

Wird die Biomasse während des Verfahrens abgetrennt, werden im allgemeinen weitere, zum Beispiel während der Fermentation zugesetzte anorganische Feststoffe entfernt. Daneben enthält das erfindungsgemäße

- 25 Tierfuttermitteladditiv zumindest den überwiegenden Teil der in der Fermentationsbrühe gelöst vorliegenden, weiteren gebildeten oder zugesetzten, insbesondere organische Stoffe, soweit sie nicht durch geeignete Verfahren abgetrennt wurden.
- 30 In einem Aspekt der Erfindung kann die Biomasse bis zu 70%, bevorzugt bis zu 80%, bevorzugt bis zu 90%, bevorzugt bis zu 95%, und besonders bevorzugt bis zu 100% abgetrennt werden. In einem weiteren Aspekt der Erfindung werden bis zu 20% der Biomasse, bevorzugt bis zu 15%, bevorzugt bis zu

10%, bevorzugt bis zu 5%, besonders bevorzugt keine Biomasse abgetrennt.

Zu diesen organischen Stoffen gehören organische Nebenprodukte, die von den bei der Fermentation 5 eingesetzten Mikroorganismen gegebenenfalls neben dem L-Methionin erzeugt und gegebenenfalls ausgeschieden werden. Dazu zählen L-Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Lysin, L-Valin, L-Threonin, L-Alanin oder L-Tryptophan. Dazu zählen Vitamine ausgewählt aus der Gruppe Vitamin B1 10 (Thiamin), Vitamin B2 (Riboflavin), Vitamin B5 (Pantothensäure), Vitamin B6 (Pyridoxin), Vitamin B12 (Cyanocobalamin), Nicotinsäure/Nicotinsäureamid und Vitamin E (Tocopherol). Dazu gehören weiterhin organische Säuren, die ein bis drei Carboxyl-Gruppen tragen wie zum Beispiel 15 Essigsäure, Milchsäure, Zitronensäure, Apfelsäure oder Fumarsäure. Schließlich gehören dazu auch Zucker wie zum Beispiel Trehalose. Diese Verbindungen sind gegebenenfalls erwünscht, wenn sie die nutritive Wertigkeit des Produktes verbessern.

20 Diese organischen Stoffe einschließlich des L-Methionins und/oder D-Methionins und/oder des racemischen Gemisches D,L-Methionin können auch je nach Anforderung während eines geeigneten Verfahrensschrittes als Konzentrat oder Reinsubstanz in fester oder flüssiger Form hinzugefügt werden. Diese genannten organischen Stoffe können einzeln 25 oder als Mischungen zur erhaltenen oder aufkonzentrierten Fermentationsbrühe, oder auch während des Trocknungs- oder Granulationsprozesses hinzugefügt werden. Es ist gleichfalls möglich einen organischen Stoff oder eine 30 Mischung mehrerer organischen Stoffe zur Fermentationsbrühe und einen weiteren organischen Stoff oder eine weitere Mischung mehrerer organische Stoffe bei einem späteren Verfahrensschritt, beispielsweise der Granulation, hinzuzufügen.

Das oben beschriebene Produkt ist als Futtermittelzusatz, d.h. Futtermittel-Additiv, für die Tierernährung geeignet.

Der L-Methionin-Gehalt des Tierfuttermittel-Additivs beträgt üblicherweise 1 Gew.-% bis 80 Gew.-%, bevorzugt 2 5 Gew.-% bis 80 Gew.-%, besonders bevorzugt 4 Gew.-% bis 80 Gew.-%, und ganz besonders bevorzugt 8 Gew.-% bis 80 Gew-%, bezogen auf die Trockenmasse des Tierfuttermittel-Additivs. Gehalte von 1 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 2 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 10 4 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 6 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 1 Gew.-% bis 40 Gew.-%, 2 Gew.-% bis 40 Gew.-% oder 4 Gew.-% bis 40 Gew.-% sind gleichfalls möglich. Der Wassergehalt des Futtermittel-Additivs beträgt üblicherweise bis zu 5 Gew.-%, bevorzugt bis zu 4 Gew.-%, und besonders bevorzugt weniger als 2 Gew.-%.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist dementsprechend ein Verfahren zur Herstellung eines L-Methionin haltigen Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen, gekennzeichnet durch die Schritte

- a) Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin produzierenden Mikroorganismus in einem Fermentationsmedium;
- b) Entfernung von Wasser aus der L-Methionin haltigen Fermentationsbrühe (Aufkonzentration);
- c) Entfernung der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 Gew.-%; und
- d) Trocknung der gemäß a) und/oder b) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.

Wenn erwünscht, können in dem erfindungsgemäßen Verfahren 25 weiterhin eine oder mehrere der folgenden Schritte durchgeführt werden:

30

- e) Zusatz von einem oder mehreren der organischen Stoffe, einschließlich L-Methionin und/oder D-Methionin und/oder des racemischen Gemisches D,L-Methionin, zu dem gemäß a), b) und/oder c) erhaltenen Produkten;
- 5 f) Zugabe von Hilfstoffen zu den nach a) bis d) erhaltenen Stoffen zur Stabilisierung und Erhöhung der Lagerfähigkeit ausgewählt aus der Gruppe Kieselsäuren, Silikate, Stearate, Schrot und Kleie; oder
- 10 g) Überführung der nach a) bis e) erhaltenen Stoffe in eine Tiermagen insbesondere Pansen stabile Form durch Beschichtung („Coating“) mit Filmbildnern.

Die Analyse von L-Lysin und L-Methionin kann durch Ionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al.

15 (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Folgender Mikroorganismus wurde als Reinkultur am 13.05.00 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

20 ◦ Corynebacterium glutamicum Stamm DSM5715/pCREmetY
als DSM 13556

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin.

Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

5 Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomal DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI

10 (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)

15 dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem

20 Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym 25 BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.

Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,

30 Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La

Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen 5 in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar 10 (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des metY-Gens

15 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27- 20 0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im 25 Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenzervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung 30 Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der

Cosmidfragmente in den Sequenzervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, 5 Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den *E. coli* Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol. Letters, 123:343-7) und auf LB-10 Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-15 Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems 20 (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" 25 Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die 30 Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1313 Basenpaaren, welches als metY-Gen bezeichnet wurde. Das metY-Gen kodiert für ein Protein 5 von 437 Aminosäuren.

Beispiel 3

Konstruktion von Vektoren zur Expression von metY und metAY

3.1. Amplifikation der Gene metY und metA

Die Methioninbiosynthese-Gene metA und metY aus C.

10 glutamicum wurden unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischer Oligonukleotide amplifiziert. Ausgehend von den Nukleotidsequenzen der Methioninbiosynthese-Gene metY (SEQ ID No.1) und metA (Genbankeintrag Accession Number AF052652) von C.

15 glutamicum ATCC 13032 wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland). Diese Primer wurden so ausgewählt, daß die amplifizierten Fragmente die Gene sowie deren native Ribosomen-Bindestellen, nicht aber mögliche Promotor-Regionen enthalten. Zusätzlich wurden geeignete

20 Restriktionsschnittstellen eingefügt, die das Klonieren in den Zielvektor ermöglichen. Die Sequenzen der PCR-Primer, die eingefügten Schnittstellen (Sequenz unterstrichen) sowie das amplifizierte Gen (Fragmentgröße, in bp, ist in Klammern aufgelistet) sind in der folgenden Tabelle 1

25 aufgelistet.

Tabelle 1

Primer	Sequenz mit Restriktionsschnittstelle	Produkt	Plasmid
metY-EVP5	5' - CTAATAAG <u>TCGAC</u> AAAGGAGGACA SalI ACCATGCCAAAGTACGAC- 3'	metY (1341 bp)	pCREmetY
metY-EVP3	5' - GAGTCTA <u>ATGCATGCTAGATTGCA</u> NsiI GCAAAGCCG 3'		
meta-EVP5	5' - AGAAC <u>GAATTCAAAGGAGGACAAC</u> EcoRI CATGCCACC <u>CTCGCGC</u> -3'	meta (1161 bp)	pCREmeta
meta-EVP3	5' - GTCGT <u>GGATCCCCTATTAGATGTA</u> PstI GAAC <u>TCG</u> -3'		

Die PCR-Experimente wurden mit der Taq DNA Polymerase der Firma Gibco-BRL (Eggestein, Deutschland) in einem "PCT-100

5 "Thermocycler" (MJ Research Inc., Watertown, Mass., USA)
 durchgeführt. Auf einen einmaligen Denaturierungsschritt von 2 Minuten bei 94°C folgte ein Denaturierungsschritt von 90 Sekunden (Sek) bei 94°C, ein Annealingschritt für 90 Sek bei einer Primer-abhängigen Temperatur von $T = (2 \times AT + 4 \times GC) - 5$ C (Suggs, et al., 1981, S. 683-693, In: D.D. Brown, and C.F. Fox (Eds.), Developmental Biology using Purified Genes. Academic Press, New York, USA) sowie ein 90 Sek dauernder Extensionsschritt bei 72°C. Die letzten drei Schritte wurden 35 mal zyklisch wiederholt und die Reaktion 15 wurde mit einem finalen Extensionsschritt von 10 Minuten (min) bei 72°C beendet. Die so amplifizierten Produkte wurden in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch geprüft.

Das 1341 bp große metY Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen SalI und NsiI gespalten, das 1161 bp große metA Fragment mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI. Beide Ansätze wurden geelektrophoretisch 5 aufgetrennt und die Fragmente metY (ca. 1330 bp) und metA (ca. 1150 bp) aus dem Agarosegel mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany) isoliert.

3.2. Klonierung von metY in den Vektor pZ8-1

10 Als Basisvektor zur Expression sowohl in *C. glutamicum* als auch in *E. coli* wurde der *E. coli* - *C. glutamicum* - Shuttle - Expressionsvektor pZ8-1 (EP 0 375 889) eingesetzt. DNA dieses Plasmids wurde mit den Restriktionsenzymen SalI und PstI vollständig gespalten und anschließend mit shrimp 15 alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Das in Beispiel 3.1 aus dem Agarosegel isolierte metY-Fragment wurde mit dem so vorbereiteten Vektor pZ8-1 gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase 20 (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04) behandelt.

Der Ligationsansatz wurde in den *E. coli* Stamm DH5 α (Hanahan, In: DNA Cloning. A Practical Approach. Vol. I. 25 IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Kanamycin. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante 30 Einzelklone selektiert. Plasmid DNA wurde aus einer Transformante mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und durch Restriktionsspaltung überprüft. Das erhaltene Plasmid wurde pCREmetY genannt. Es ist in Figur 35 1 dargestellt.

3.3. Klonierung von metA und metY in den Vektor pZ8-1

DNA des Plasmids pZ8-1 wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI vollständig gespalten und anschließend mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Das in Beispiel 3.1 aus dem

Agarosegel isolierte metA-Fragment wurde mit dem so vorbereiteten Vektor pZ8-1 gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,

Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04) behandelt.

Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm DH5 α (Hanahan, In: DNA Cloning. A Practical Approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA) transformiert. Die

Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Kanamycin. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektiert. Plasmid DNA wurde aus einer

Transformante mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und durch Restriktionsspaltung überprüft. Das erhaltene Plasmid wurde pCREmetA genannt.

Das Plasmid pCREmetA wurde mit den Restriktionsenzymen SalI und PstI vollständig gespalten und anschließend mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Das in Beispiel 3.1 aus dem Agarosegel isolierte metY-Fragment wurde mit dem so vorbereiteten

Vektor pCREmetA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04) behandelt.

Der Ligationsansatz wurde in den *E. coli* Stamm DH5 α (Hanahan, In: DNA cloning. A Practical Approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch 5 Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Kanamycin. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert. Plasmid DNA wurde aus einer Transformante mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product 10 No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und durch Restriktionsspaltung überprüft. Das erhaltene Plasmid wurde pCREmetAY genannt. Es ist in Figur 2 dargestellt.

Beispiel 4

15 Herstellung der Stämme DSM5715/pCREmetY und DSM5715/pCREmetAY

Die in Beispiel 3.2 und 3.3 genannten Vektoren pCREmetY und pCREmetAY wurden mit der Elektroporationsmethode von Tauch et al. (1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) in 20 *Corynebacterium glutamicum* DSM 5715 elektroporiert. Bei dem Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten Lysin-Produzenten. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporations-ansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A 25 Laboratory Manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid DNA wurde nach den üblichen Methoden aus jeweils einer Transformante isoliert (Peters-Wendisch et al., 1998, Microbiology, 144, 30 915-927) und durch Restriktionsspaltung mit anschließender Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Die Stämme wurden DSM5715/pCREmetY und DSM5715pCREmetAY genannt. Der Stamm DSM5715/pCREmetY wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig,

Deutschland) gemäß Budapester Vertrag als DSM 13556 hinterlegt.

Beispiel 5

Herstellung von Lysin mit dem Stamm DSM5715/pCREmetY

5 Der in Beispiel 4 erhaltene C. glutamicum Stamm DSM5715/pCREmetY wurde in einem zur Produktion von Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

10 Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz-Agar mit Kanamycin (50 mg/l)) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

15 Medium Cg III

NaCl 2,5 g/l

Bacto-Pepton 10 g/l

Bacto-Yeast-Extrakt 10 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4 eingestellt

20 Diesem wurde Kanamycin (50 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,1 betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor)	5 g/l
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	25 g/l
KH_2PO_4	0,1 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	1,0 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,0 mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
L-Leucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
CaCO_3	25 g/l

CSL, MOPS und die Salzlösung wurden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend wurden die 5 sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO_3 .

Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (50 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 10 80% Luftfeuchtigkeit.

Nach 48 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH,

München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 2 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 2

Stamm	OD(660)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	10,6	15,7
DSM5715/pCREmetY	9,5	16,1

Beispiel 6

10 Herstellung von Methionin mit dem Stamm DSM5715/pCREmetAY

Der in Beispiel 4 erhaltene *C. glutamicum* Stamm DSM5715/pCREmetAY wurde in einem zur Produktion von Methionin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Methioningehalt im Kulturüberstand bestimmt.

15 Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz-Agar mit Kanamycin (50 mg/l)) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für 20 die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII, wie in Beispiel 5 beschrieben, verwendet.

25 Diesem wurde Kanamycin (50 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur

0,1 betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM wie in Beispiel 5 beschrieben, verwendet.

CSL, MOPS und die Salzlösung wurden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend wurden die 5 sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO_3 .

Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (50 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 10 80% Luftfeuchtigkeit.

Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Methioninmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik 15 (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 3 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 3

Stamm	OD(660)	Methionin-HCl mg/l
DSM5715	6,6	1,4
DSM5715/pCREmetAY	8,3	16,0

Folgende Abbildungen sind beigefügt:

- Abbildung 1: Plasmid pCREmetY
- Abbildung 2: Plasmid pCREmetAY

Die in den Abbildungen verwendeten Abkürzungen haben
5 folgende Bedeutung:

Kan:	Resistenzgen für Kanamycin
metY:	metY-Gen von C. glutamicum
metA:	metA-Gen von C. glutamicum
Ptac:	tac-Promotor
10 rrnB-T1T2:	Terminator T1T2 des rrnB-Gens von E.coli
rep:	Plasmidkodierter Replikationsursprung für C. glutamicum (von pHM1519)
BamHI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms BamHI
EcoRI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms EcoRI
15 EcoRV:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms EcoRV
PstI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms PstI
SalI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms SalI
XhoI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms XhoI

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Neue für das metY-Gen kodierende Nukleotisequenzen

<130> 000053 BT

<140>

10 <141>

<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1720

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (200)..(1510)

25 <223> metY-Gen

<400> 1

catcctacac cattagagt gggctagtc ataccccat aaccctagct gtacgcaatc 60

30 gattcaaat cagttggaaa aagtcaagaa aattacccga gaataaattt ataccacaca 120

gtctattgca atagaccaag ctgttcagta gggtgcattgg gagaagaatt tcctaataaa 180

aactcttaag gaccccaa atg cca aag tac gac aat tcc aat gct gac cag 232

Met Pro Lys Tyr Asp Asn Ser Asn Ala Asp Gln

35 1

5

10

tgg ggc ttt gaa acc cgc tcc att cac gca ggc cag tca gac gca 280
Trp Gly Phe Glu Thr Arg Ser Ile His Ala Gly Gln Ser Val Asp Ala

15

20

25

40 cag acc agc gca cga aac ctt ccg atc tac caa tcc acc gct ttc gtg 328
Gln Thr Ser Ala Arg Asn Leu Pro Ile Tyr Gln Ser Thr Ala Phe Val
30 35 4045 ttc gac tcc gct gag cac gcc aag cag cgt ttc gca ctt gag gat cta 376
Phe Asp Ser Ala Glu His Ala Lys Gln Arg Phe Ala Leu Glu Asp Leu
45 50 5550 ggc cct gtt tac tcc cgc ctc acc aac cca acc gtt gag gct ttg gaa 424
Gly Pro Val Tyr Ser Arg Leu Thr Asn Pro Thr Val Glu Ala Leu Glu
60 65 70 7555 aac cgc atc gct tcc ctc gaa ggt ggc gtc cac gct gta gcg ttc tcc 472
Asn Arg Ile Ala Ser Leu Glu Gly Val His Ala Val Ala Phe Ser
80 85 90

	tcc gga cag gcc gca acc acc aac gcc att ttg aac ctg gca gga gcg Ser Gly Gln Ala Ala Thr Thr Asn Ala Ile Leu Asn Leu Ala Gly Ala 95 100 105	520
5	ggc gac cac atc gtc acc tcc cca cgc ctc tac ggt ggc acc gag act Gly Asp His Ile Val Thr Ser Pro Arg Leu Tyr Gly Gly Thr Glu Thr 110 115 120	568
10	cta ttc ctt atc act ctt aac cgc ctg ggt atc gat gtt tcc ttc gtg Leu Phe Leu Ile Thr Leu Asn Arg Leu Gly Ile Asp Val Ser Phe Val 125 130 135	616
15	gaa aac ccc gac gac cct gag tcc tgg cag gca gcc gtt cag cca aac Glu Asn Pro Asp Asp Pro Glu Ser Trp Gln Ala Ala Val Gln Pro Asn 140 145 150 155	664
20	acc aaa gca ttc ttc ggc gag act ttc gcc aac cca cag gca gac gtc Thr Lys Ala Phe Phe Gly Glu Thr Phe Ala Asn Pro Gln Ala Asp Val 160 165 170	712
25	ctg gat att cct gcg gtg gct gaa gtt gcg cac cgc aac agc gtt cca Leu Asp Ile Pro Ala Val Ala Glu Val Ala His Arg Asn Ser Val Pro 175 180 185	760
30	ctg atc atc gac aac acc atc gct acc gca gcg ctc gtg cgc ccg ctc Leu Ile Ile Asp Asn Thr Ile Ala Thr Ala Ala Leu Val Arg Pro Leu 190 195 200	808
35	gag ctc ggc gca gac gtt gtc gtc gct tcc ctc acc aag ttc tac acc Glu Leu Gly Ala Asp Val Val Val Ala Ser Leu Thr Lys Phe Tyr Thr 205 210 215	856
40	ggc aac ggc tcc gga ctg ggc gtc ctt atc gac ggc gga aag ttc Gly Asn Gly Ser Gly Leu Gly Gly Val Leu Ile Asp Gly Gly Lys Phe 220 225 230 235	904
45	gat tgg act gtc gaa aag gat gga aag cca gta ttc ccc tac ttc gtc Asp Trp Thr Val Glu Lys Asp Gly Lys Pro Val Phe Pro Tyr Phe Val 240 245 250	952
50	act cca gat gct gct tac cac gga ttg aag tac gca gac ctt ggt gca Thr Pro Asp Ala Ala Tyr His Gly Leu Lys Tyr Ala Asp Leu Gly Ala 255 260 265	1000
55	cca gcc ttc ggc ctc aag gtt cgc gtt ggc ctt cta cgc gac acc ggc Pro Ala Phe Gly Leu Lys Val Arg Val Gly Leu Leu Arg Asp Thr Gly 270 275 280	1048
	tcc acc ctc tcc gca ttc aac gca tgg gct gca gtc cag ggc atc gac Ser Thr Leu Ser Ala Phe Asn Ala Trp Ala Ala Val Gln Gly Ile Asp 285 290 295	1096
	acc ctt tcc ctg cgc ctg gag cgc cac aac gaa aac gcc atc aag gtt Thr Leu Ser Leu Arg Leu Glu Arg His Asn Glu Asn Ala Ile Lys Val 300 305 310 315	1144
	gca gaa ttc ctc aac aac cac gag aag gtg gaa aag gtt aac ttc gca Ala Glu Phe Leu Asn Asn His Glu Lys Val Glu Lys Val Asn Phe Ala 320 325 330	1192

ggc ctg aag gat tcc cct tgg tac gca acc aag gaa aag ctt ggc ctg Gly Leu Lys Asp Ser Pro Trp Tyr Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gly Leu 335 340 345	1240
5 aag tac acc ggc tcc gtt ctc acc ttc gag atc aag ggc ggc aag gat Lys Tyr Thr Gly Ser Val Leu Thr Phe Glu Ile Lys Gly Gly Lys Asp 350 355 360	1288
10 gag gct tgg gca ttt atc gac gcc ctg aag cta cac tcc aac ctt gca Glu Ala Trp Ala Phe Ile Asp Ala Leu Lys Leu His Ser Asn Leu Ala 365 370 375	1336
15 aac atc ggc gat gtt cgc tcc ctc gtt gtt cac cca gca acc acc acc Asn Ile Gly Asp Val Arg Ser Leu Val Val His Pro Ala Thr Thr Thr 380 385 390 395	1384
20 cat tca cag tcc gac gaa gct ggc ctg gca cgc gcg ggc gtt acc cag His Ser Gln Ser Asp Glu Ala Gly Leu Ala Arg Ala Gly Val Thr Gln 400 405 410	1432
25 tcc acc gtc cgc ctg tcc gtt ggc atc gag acc att gat gat atc atc Ser Thr Val Arg Leu Ser Val Gly Ile Glu Thr Ile Asp Asp Ile Ile 415 420 425	1480
30 gct gac ctc gaa ggc ggc ttt gct gca atc tagtttaaa tagactcacc Ala Asp Leu Glu Gly Phe Ala Ala Ile 430 435	1530
35 ccagtgctta aagcgctggg tttttctttt tcagactcgt gagaatgcaa actagactag acagagctgt ccatatacac tggacgaagt ttttagtcttg tccacccaga acaggcggtt attttcatgc ccaccctcgc gccttcaggt caacttgaaa tccaagcgat cggtgatgtc tccaccgaag	1590 1650 1710 1720
40 <210> 2 <211> 437 <212> PRT <213> Corynebacterium glutamicum	
45 <400> 2 Met Pro Lys Tyr Asp Asn Ser Asn Ala Asp Gln Trp Gly Phe Glu Thr 1 5 10 15	
50 Arg Ser Ile His Ala Gly Gln Ser Val Asp Ala Gln Thr Ser Ala Arg 20 25 30	
Asn Leu Pro Ile Tyr Gln Ser Thr Ala Phe Val Phe Asp Ser Ala Glu 35 40 45	
55 His Ala Lys Gln Arg Phe Ala Leu Glu Asp Leu Gly Pro Val Tyr Ser 50 55 60	
Arg Leu Thr Asn Pro Thr Val Glu Ala Leu Glu Asn Arg Ile Ala Ser 65 70 75 80	

Leu Glu Gly Gly Val His Ala Val Ala Phe Ser Ser Gly Gln Ala Ala
 85 90 95

5 Thr Thr Asn Ala Ile Leu Asn Leu Ala Gly Ala Gly Asp His Ile Val
 100 105 110

Thr Ser Pro Arg Leu Tyr Gly Gly Thr Glu Thr Leu Phe Leu Ile Thr
 115 120 125

10 Leu Asn Arg Leu Gly Ile Asp Val Ser Phe Val Glu Asn Pro Asp Asp
 130 135 140

Pro Glu Ser Trp Gln Ala Ala Val Gln Pro Asn Thr Lys Ala Phe Phe
 145 150 155 160

15 Gly Glu Thr Phe Ala Asn Pro Gln Ala Asp Val Leu Asp Ile Pro Ala
 165 170 175

20 Val Ala Glu Val Ala His Arg Asn Ser Val Pro Leu Ile Ile Asp Asn
 180 185 190

Thr Ile Ala Thr Ala Ala Leu Val Arg Pro Leu Glu Leu Gly Ala Asp
 195 200 205

25 Val Val Val Ala Ser Leu Thr Lys Phe Tyr Thr Gly Asn Gly Ser Gly
 210 215 220

Leu Gly Gly Val Leu Ile Asp Gly Gly Lys Phe Asp Trp Thr Val Glu
 225 230 235 240

30 Lys Asp Gly Lys Pro Val Phe Pro Tyr Phe Val Thr Pro Asp Ala Ala
 245 250 255

Tyr His Gly Leu Lys Tyr Ala Asp Leu Gly Ala Pro Ala Phe Gly Leu
 35 260 265 270

Lys Val Arg Val Gly Leu Leu Arg Asp Thr Gly Ser Thr Leu Ser Ala
 275 280 285

40 Phe Asn Ala Trp Ala Ala Val Gln Gly Ile Asp Thr Leu Ser Leu Arg
 290 295 300

Leu Glu Arg His Asn Glu Asn Ala Ile Lys Val Ala Glu Phe Leu Asn
 305 310 315 320

45 Asn His Glu Lys Val Glu Lys Val Asn Phe Ala Gly Leu Lys Asp Ser
 325 330 335

50 Pro Trp Tyr Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Thr Gly Ser
 340 345 350

Val Leu Thr Phe Glu Ile Lys Gly Gly Lys Asp Glu Ala Trp Ala Phe
 355 360 365

55 Ile Asp Ala Leu Lys Leu His Ser Asn Leu Ala Asn Ile Gly Asp Val
 370 375 380

Arg Ser Leu Val Val His Pro Ala Thr Thr His Ser Gln Ser Asp
 385 390 395 400

Glu Ala Gly Leu Ala Arg Ala Gly Val Thr Gln Ser Thr Val Arg Leu
405 410 415

5 Ser Val Gly Ile Glu Thr Ile Asp Asp Ile Ile Ala Asp Leu Glu Gly
420 425 430

Gly Phe Ala Ala Ile
435

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das metY-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - 15 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c), wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2 oder 3, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2 oder 3, enthaltend
 - 30 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder

5 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

10 6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung der Sequenz (iii) unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.

7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2 oder 3, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.

15 8. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:

20 a) Fermentation der die gewünschte Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das metY-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert;

25 b) Anreicherung von der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien; und

c) Isolieren von der L-Aminosäure.

30 9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:

a) Fermentation der die L-Methionin produzierenden

coryneformen Bakterien, in denen man das Gen metY gegebenenfalls mit metA verstärkt, insbesondere überexprimiert;

5 b) Anreicherung von der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien; und
c) Isolieren von der L-Aminosäure.

10. Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

15 11. Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten Aminosäure verringern.

20 12. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor das metY-Gen und gegebenenfalls zusätzlich das metA-Gen trägt.

25 13. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für die Gene metA und metY kodierende Nukleotidsequenz trägt.

30 14. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

14.1 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap,

14.2 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi,

14.3 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk

5 14.4 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc

14.5 das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,

verstärkt, insbesondere überexprimiert.

10 15. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt 15 aus der Gruppe

15.1 das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,

15.2 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap,

20 15.3 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi,

15.4 das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA,

25 15.5 das für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB,

15.6 das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende Gen aecD,

15.7 das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA

15.8 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk

15.9 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc

5 verstärkt, insbesondere überexprimiert.

16. Verfahren gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, coryneformen Mikroorganismen fermentiert, welche eine zusätzliche Verstärkung des metY Gens durch metA aufweisen.

10

17. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, coryneformen Mikroorganismen fermentiert, welche eine zusätzliche Verstärkung des metY Gens durch Abschwächung, insbesondere Verringerung der Expression eines oder mehrerer Gene ausgewählt aus der Gruppe

15

17.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck

20

17.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi

17.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB.

18. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

25

30

18.1 das für die Homoserine - Kinase kodierende Gen thrB

- 18.2 das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA
- 18.3 das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC
- 18.4 das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase 5 kodierende Gen ddh
- 18.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck
- 18.6 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi
- 10 18.7 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
abschwächt bzw. die Expression verringert.
19. Coryneformen Bakterien, in denen das metY-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
20. Coryneformen Bakterien, die einen Vektor enthalten, der 15 ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
21. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* einsetzt.
- 20 22. Verfahren zur Herstellung eines L-Methionin haltigen Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen, gekennzeichnet durch die Schritte
a) Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin produzierenden Mikroorganismus in einem Fermentationsmedium;
- 25 b) Entfernung von Wasser aus der L-Methionin haltigen Fermentationsbrühe (Aufkonzentration);

- c) Entfernung der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 Gew.-%; und
- d) Trocknung der gemäß b) und/oder c) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.

23. Verfahren gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet dass daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges von L-Methionin verstärkt.

24. Verfahren gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung L-Methionin verringern.

25. Verfahren gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß man die Expression der Polynukleotide, die für das metY-Gen kodieren verstärkt, insbesondere überexprimiert.

26. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche 22-25, dadurch gekennzeichnet, daß man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* einsetzt.

27. Verfahren gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet dass man zusätzlich noch einen oder mehrere folgender Schritte durchführt:

- e) Zusatz von einem oder mehreren der organischen Stoffe, einschließlich L-Methionin und/oder D-Methionin und/oder des racemischen Gemisches D,L-Methionin, zu dem gemäß b), c) und/oder d) erhaltenen Produkten;

- f) Zugabe von Hilfsstoffen zu den nach b) bis e) erhaltenen Stoffen zur Stabilisierung und Erhöhung der Lagerfähigkeit ausgewählt aus der Gruppe Kieselsäuren, Silikate, Stearate, Schrot und Kleie; oder
- 5 g) Überführung der nach b) bis f) erhaltenen Stoffe in eine Tiermagen insbesondere Pansen stabile Form durch Beschichtung („Coating“) mit Filmbildnern.

10 28. Verfahren gemäß Anspruch 22 oder 27, dadurch gekennzeichnet dass ein Teil der Biomasse entfernt wird.

29. Verfahren gemäß Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet dass bis zu 100% der Biomasse entfernt wird.

15 30. Verfahren gemäß Anspruch 22 oder 27, dadurch gekennzeichnet dass der Wassergehalt bei bis zu 5 Gew.-% liegt.

31. Verfahren gemäß Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet dass der Wassergehalt bei weniger als 2 Gew.-% liegt.

20 32. Verfahren gemäß Anspruch 27, 28, 29, 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet dass die Filmbildner Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginate, Stearate, Stärken, Gummis oder Celluloseether sind.

25 33. Tierfuttermittel-Additiv hergestellt gemäß Ansprüchen 22 bis 32.

34. Tierfuttermittel-Additiv gemäß Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet dass es 1 Gew.-% bis 80 Gew.-% L-Methionin, D-Methionin, D,L-Methionin oder einer Mischung davon, bezogen auf die Trockenmasse des

30 Tierfuttermittel-Additivs, enthält.

35. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für die O-Acetylhomoserin-Sulphydrolase kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des metY-Gens aufweisen, d a d u r c h
5 g e k e n n z e i c h n e t, daß man das Polynukleotid, enthaltend die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4 als Hybridisierungssonden einsetzt.

10 36. *Corynebacterium glutamicum* Stamm DM5715/pCREmetY hinterlegt bei der DSMZ, Braunschweig, unter der Nr. DSM 12840.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 15 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das metY-Gen verstärkt vorliegt, und die 20 Verwendung der Polynukleotide, die die erfindungsgemäßen polynukleotidsequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.

Figure 1: Plasmid pCREmetY

5

10

15

20

25

30

35

40

45

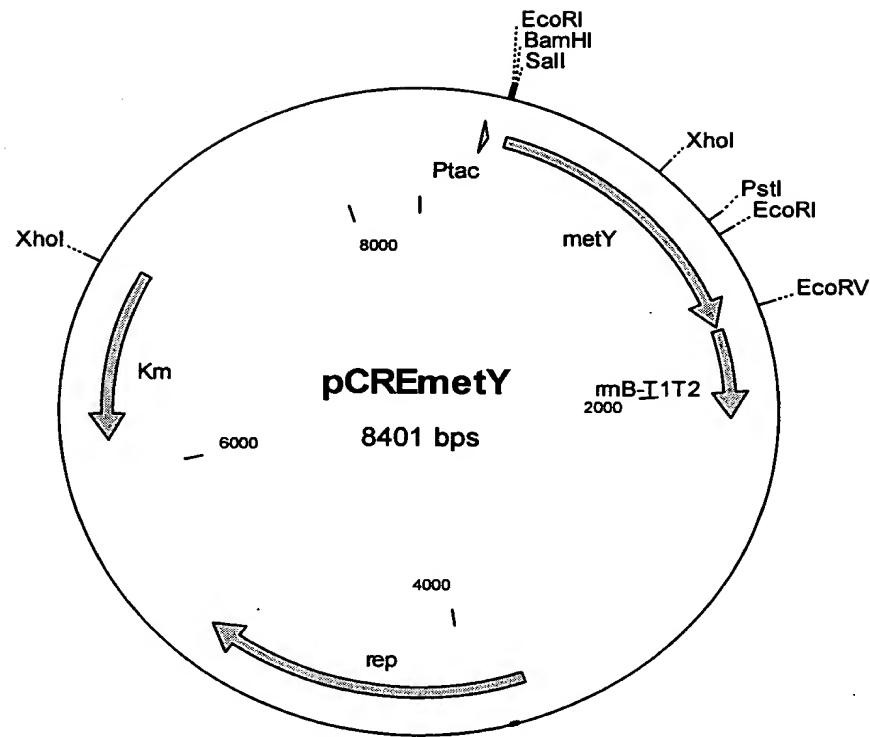


Figure 2: Plasmid pCREmetAY

5

10

15

20

25

30

